

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2002 年 5 月 2 日 (02.05.2002)

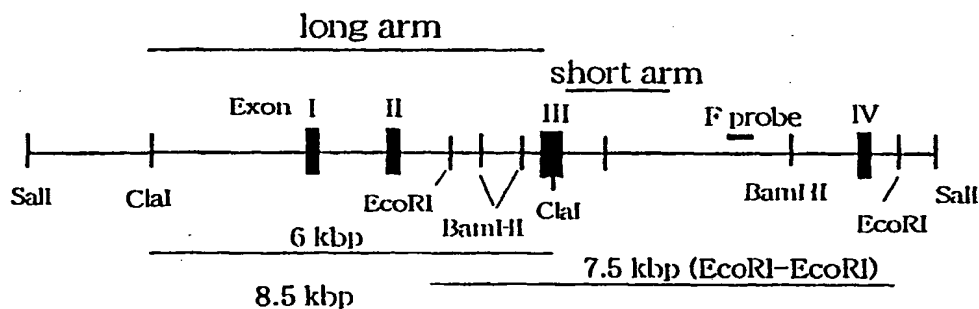
PCT

(10) 国際公開番号  
WO 02/34041 A1

- (51) 国際特許分類: A01K 67/027, C12N 15/12, C07K 14/47, C12P 21/08, C12N 15/06 (74) 代理人: 川和高穂(KAWAWA, Takaho); 〒108-0073 東京都港区三田三丁目1番10号 Tokyo (JP).
- (21) 国際出願番号: PCT/JP01/09243 (81) 指定国 (国内): JP, US.
- (22) 国際出願日: 2001 年 10 月 22 日 (22.10.2001) (84) 指定国 (広域): ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR).
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語 添付公開書類: 国際調査報告書
- (30) 優先権データ: 2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。  
特願 2000-322234  
2000 年 10 月 23 日 (23.10.2000) JP
- (71) 出願人 および  
(72) 発明者: 丸山直記 (MARUYAMA, Naoki) [JP/JP]; 〒173-0015 東京都板橋区栄町18-5-501 Tokyo (JP). 笠原靖 (KASAHARA, Yasushi) [JP/JP]; 〒206-0022 東京都多摩市聖ヶ丘4-24-6 Tokyo (JP).

(54) Title: SENESCENCE MARKER PROTEIN 30-DEFECTIVE NONHUMAN ANIMAL, ANTIBODY AND METHOD OF CONSTRUCTING THE SAME

(54) 発明の名称: セネッセンスマーカープロテイン30欠損非ヒト動物、抗体およびその作製方法



(57) Abstract: An SMP30-defective nonhuman animal in which the defect of the SMP30 function is caused by the deletion of at least a part of the DNA sequence in chromosomal SMP30 gene, inserting another sequence, substituting at least a part of the DNA sequence by another sequence, or combining these procedures.

(57) 要約:

SMP30の機能の欠損が、染色体SMP30遺伝子において、少なくとも一部のDNA配列を欠失させるか、他の配列を挿入するか、若しくは少なくとも一部のDNA配列を他の配列へ置換するか、又はこれらの組み合わせによるものであるSMP30欠損非ヒト動物。

WO 02/34041 A1

## 明細書

セネッセンスマーカープロテイン 30 欠損非ヒト動物、抗体およびその作製方法

## 技術分野

本発明はセネッセンスマーカープロテイン 30 (Senescence Marker Protein 30、以下「SMP 30」という) の機能が欠損した新規な系統の動物とその作出法、及び本発明による動物を用いて作製した抗体とその作出法に関する。

## 従来の技術

発生工学的技術の発展と分子生物学の知識の蓄積に伴い、遺伝子を人為的に操作し、動物個体へ導入して、種々の遺伝子改変動物の作製が試みられている。これらはいわゆる遺伝子組換え (トランスジェニック) 動物と呼ばれ、医学・生物学領域で様々な応用が期待され、特に、遺伝子操作により特定の蛋白質を欠損させた動物モデルは、クローニングされた遺伝子の、生体内での生理学的機能や、疾患との関連性の解析において、最も強力な手段のひとつとされている。

例えばマウスでは E S 細胞 (Embryonic Stem Cell ; 胚性幹細胞) において、遺伝子の相同的組換えを利用する手法により、遺伝子および遺伝子産物欠損マウス (いわゆるノックアウトマウス) の作製が可能である (Koller ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、第 86 巻、8927~8931 頁、1989 年)。

一般に、特定の遺伝子産物を欠損させる方法としては、目的とする蛋白質をコードする遺伝子を破壊することが行われる。具体的には破壊する標的遺伝子のクローニングを行い、その遺伝子内部に挿入するターゲッティングベクターを作製する。このベクターはマウス E S 細胞に導入され、相同的組換えが行われる。組換えが生じた E S 細胞を受精卵の 8 細胞期胚に吸着させ、あらかじめ偽妊娠させておいた仮親の卵管に移植し、出生させる。その後出生したマウスの尾部より DNA を抽出し、PCR 法 (Polymerase Chain Reaction) あるいはサザンハイブリダイゼーションにより標的遺伝子の組換えを確認する。このマウスをさらに退交配し、純系のノックアウトマウス系として確立する。

破壊される遺伝子は必ずしも目的とする蛋白質をコードする遺伝子に限定されない。ある特定遺伝子について、その転写から翻訳にいたる一連の過程のいずれか、あるいは、その遺伝子産物（蛋白質）が正常に機能するために、翻訳後のプロセッシングが必要であるなら、その過程のいずれかを阻害するような遺伝子の改変も、当該蛋白質の欠損となる。この場合どの過程が阻害されるかによって、当該蛋白質がまったく産生されなかったり、あるいは産生されても機能しない等の様々な表現型を示す。

こうして作製されたノックアウトマウスには通常生殖細胞を含めた全ての細胞に外来遺伝子により破壊された遺伝子が組み込まれており、メンデルの法則に従って正確に子孫に伝達される。即ち新規に作成されたノックアウトマウスは、1つの新しい系統として樹立することができ、繁殖能力が損なわれない限り、交配を繰り返すことによって同じ遺伝的資質を持った実験動物として供給し続けることが可能である。また導入する遺伝子の上流にプロモーターやエンハンサーなどの遺伝子制御領域をつなぐことにより組織特異的に発現を制御することも可能である。

一方、生物学的分析に欠かすことのできない抗体の作成と利用は歴史も長く、特にモノクローナル抗体の作製法はすでに1975年に報告されている。以来、その方法はモノクローナル抗体の有益性とあいまって研究者に広く伝播し、今日の分子生物学の基礎を築く一翼となったといっても過言ではない。例えば分子生物学の実験教科書として世界で最もひろく読まれている *Methods in Enzymology* ではすでに1981年にモノクローナル抗体の作製方法が確立された方法として記載されている。しかしそこではモノクローナル抗体産生ハイブリドーマ細胞の確立は決して簡単ではないことが記され、できれば何種類かの動物を用いることを勧めている (*Methods in Enzymology* 73巻 第1章 Production of Antibodies 1981年 Academic Press)。

抗体が時として十分な反応性を持たない場合があることは広く知られている。しかしその原因のひとつが、目的とする抗体の抗原が、免疫される側の同種タンパク質と相同性が高いことはほとんど見逃されてきた。上記のMethods in Enzymology でも動物によって抗体の性質に差が出ることを認めつつ、抗原となるタンパク質の相同性についての言及は一切ない。

このことは、ポリクローナル抗体の作製においても同様で、「実験生物学講座」の「14巻免疫生物学」（丸善、昭和57年）では「経験から“抗原の種類と動物種の組合せ”が良い抗体を作るために必要である」としているが、目的とする抗体の抗原と、宿主の同種タンパク質との間の相同性には一切触れられていない。しかし一般には、生物にとって重要または必須なタンパク質は進化の過程でもよく保存され、種間の相同性が高いことが知られている。即ち、生物にとって重要なタンパク質であるほど、抗体が作製しにくい傾向にあり、SMP30はこの典型的な例である。

SMP30は加齢に伴い減少するラット肝細胞内の蛋白質として1992年に報告され(Fujitaら、Biochim Biophys Acta、第1116巻、122～128、1992年)、そのアミノ酸配列やcDNA配列もヒト(Fujitaら、Biochim Biophys Acta、第1263巻、249～252、1995年)、ラット(Fujitaら、Biochim Biophys Acta、第1132巻、297～305、1992年)、マウス(Fujitaら、Biochim Biophys、第1308巻、49～57、1996年)や、ラビット、ウシ、ニワトリ、ヒキガエル(toad)(Misawaら、Int J Mol Med、第6巻、191～196、2000年)においてすでに決定されている。またマウスについてはジェノミックDNA配列と構造も報告された(Fujitaら、Biochim Biophys、第1308巻、49～57、1996年)。Fujita・Maruyamaら以外の研究グループも遅れて同一の物質のクローニングを行いregucalcinと称しているが、以下、SMP30という名称で統一する(また、SMP30をコードする染色体上の遺伝子を以下SMP30遺伝子という)。

本願発明者は、先にヒトSMP30でウサギを免疫することにより、抗ヒトSMP30ポリクローナル抗体の作製に成功し、特許出願した（特開平7-97399号公報）。

加齢に伴い各臓器では多様な病変を発症する。内的あるいは外的刺激により臓器を構成する細胞は障害を受ける。その際に重要な細胞内事象は細胞内カルシウムの上昇である。細胞内カルシウムは種々の細胞機能に必要なイオンではあるが過剰な上昇は細胞膜障害を始めとして細胞機能を著しく低下させる。従って細胞機能の維持において細胞内カルシウムの恒常性維持は必須である。

SMP30は新しいタイプのカルシウム結合蛋白質であり、細胞膜カルシウムポンプを活性化することにより細胞内カルシウムの恒常性を保つ生物機能を持っていることが知られている。しかしながら、ヒトを含めた生物種におけるSMP30の働きの詳細・機序は十分に解明されておらず、特に疾患との関連、各種病態への関与等、解明すべき点が数多く残されている。これらの問題を解決する上で、SMP30が欠損した動物モデルの提供が必須である。

また、本願発明者は、上記の通り、ヒトSMP30でウサギを免疫することにより、抗ヒトSMP30ポリクローナル抗体を作製した（特開平7-97399号公報）。しかしながら、この抗ヒトSMP30ポリクローナル抗体のヒトSMP30に対する反応性はあまり高くなく、満足できるものではなかった。また、特開平7-97399号公報記載の方法に従ってヒトSMP30で免疫した動物から常法によりモノクローナル抗体を作製しようとしても、抗ヒトSMP30モノクローナル抗体を得ることはできなかった。

従って、本発明の目的は、SMP30が欠損した非ヒト動物を提供することである。また、本発明の目的は、従来技術では作製することができなかった反応性が高い抗SMP30抗体を提供すること、及びその作製を可能にする手段を提供することである。

## 発明の開示

本願発明者らは、上記課題を解決するために鋭意検討を重ねた結果、従来技術において、反応性が高い抗ヒトSMP30抗体や抗ヒトSMP30モノクローナル抗体を作製することができなかった原因は、SMP30のアミノ酸配列の異種間での相同性の高さにあるのではないかとすることに想到した。すなわち、健全な動物個体では、自己のタンパク質に対する抗体は産生されない（免疫寛容）。このため、その動物にとっての自己タンパク質と相同性の高い異種動物のタンパク質を免疫しても、免疫寛容のために、自己タンパク質と相同な部分に対する抗体は生産されず、異なる領域のみが免疫原として作用し、このため、得られるポリクローナル抗体の反応性が低く、また、モノクローナル抗体が得られる確率が非常に小さくなることが原因ではないかとすることに想到した。

そして、もしそうならば、動物自身のSMP30遺伝子を破壊したSMP30欠損（ノックアウト）動物を作製し、これにヒトSMP30を免疫すれば、この欠損動物は自己SMP30を持たないので、異種SMP30の全体が免疫原として作用し、高い反応性を有する抗SMP30抗体や、抗SMP30モノクローナル抗体を作出できるのではないかとすることに想到した。そして、さらに鋭意研究した結果、SMP30の機能解析の強力な手段となるSMP30欠損動物モデルの確立に成功し、この欠損動物に異種SMP30を免疫することにより、反応性の高い抗SMP30ポリクローナル抗体や、抗SMP30モノクローナル抗体を実際に作出することに初めて成功し、本発明を完成した。

即ち、本発明のSMP30欠損非ヒト動物の第1の態様は、SMP30の機能が欠損した非ヒト動物である。

本発明のSMP30欠損非ヒト動物の第2の態様は、前記SMP30の機能の欠損が、染色体SMP30遺伝子において、少なくとも一部のDNA配列を欠失させるか、他の配列を挿入するか、若しくは少なくとも一部のDNA配列を他の配列へ置換するか、又はこれらの組み合わせによるものであることを特徴とする、

SMP 30欠損非ヒト動物である。

本発明のSMP 30欠損非ヒト動物の第3の態様は、SMP 30の機能の欠損が、染色体SMP 30遺伝子の発現の過程またはSMP 30のプロセッシングの過程に関わる遺伝子産物をコードする遺伝子において、少なくとも一部のDNA配列を欠失させるか、他の配列を挿入するか、若しくは少なくとも一部のDNA配列を他の配列に置換するか、又はこれらの組み合わせによるものであることを特徴とする、SMP 30欠損非ヒト動物である。

本発明のSMP 30欠損非ヒト動物の第4の態様は、前記他の配列が薬剤耐性遺伝子であることを特徴とする、SMP 30欠損非ヒト動物である。

本発明のSMP 30欠損非ヒト動物の第5の態様は、前記薬剤耐性遺伝子が、染色体SMP 30遺伝子のエキソンに挿入されたネオマイシン耐性遺伝子であることを特徴とする、SMP 30欠損非ヒト動物である。

本発明のSMP 30欠損非ヒト動物の第6の態様は、SMP 30欠損非ヒト動物が、哺乳類であることを特徴とする、SMP 30欠損非ヒト動物である。

本発明のSMP 30欠損非ヒト動物の第7の態様は、SMP 30欠損非ヒト動物がげっ歯類であることを特徴とする、SMP 30欠損非ヒト動物である。

本発明のSMP 30欠損非ヒト動物の第8の態様は、SMP 30欠損非ヒト動物がマウスであることを特徴とする、SMP 30欠損非ヒト動物である。

本発明においてはさらにSMP 30欠損非ヒト動物を免疫して得られた抗体価の高い抗SMP 30抗体を提供する。即ち本発明の抗体の第1の態様は、SMP 30欠損非ヒト動物をSMP 30で免疫して得られたSMP 30又はその一部ペプチドを抗原とする抗体である。

本発明の抗体の第2の態様は、上記記載のSMP30欠損非ヒト動物のいずれかを免疫して得られた、SMP30又はその一部ペプチドを抗原とする抗体である。

本発明の抗体の第3の態様は、脊椎動物のSMP30若しくはその一部ペプチド又は脊椎動物の一部のSMP30若しくはその一部ペプチドを共通抗原とすることを特徴とする抗体である。

本発明の抗体の第4の態様は、上記脊椎動物が哺乳動物であることを特徴とする抗体である。

本発明の抗体の第5の態様は、マウス、ラット、ヒト、ウサギ、ウシ、イヌ、ブタ、及びカエルのうちいずれか1種のSMP30若しくはその一部ペプチドで免疫して得られた抗体で、マウス、ラット、ヒト、ウサギ、ウシ、イヌ、ブタ、及びカエルすべての、若しくはこれらのうちの2種類以上の、SMP30若しくはその一部ペプチドを共通抗原とすることを特徴とする抗体である。

本発明の抗体の第6の態様は、ラットSMP30をSMP30欠損マウスに免疫して得られた、マウス、ラット、ヒト、ウサギ、ウシ、イヌ、ブタ、及びカエルすべてのSMP30若しくはその一部ペプチドを共通抗原とすることを特徴とする抗体である。

本発明の抗体の第7の態様は、抗SMP30抗体が、アミノ酸の付加、置換、欠失、挿入により修飾されたSMP30で免疫して得られたことを特徴とする抗体である。

本発明の抗体の第8の態様は、上記の抗体が、ポリクローナル抗体であることを特徴とする抗体である。



さらに本発明の抗体の第9の態様は、上記抗体が、モノクローナル抗体又はその抗原結合性フラグメントであることを特徴とする、抗体である。また、ここでいう「フラグメント」とは、抗原結合性フラグメントをいい、抗原に非結合性のフラグメント（例えばFcフラグメント）は含まない。

一方本発明においては、SMP30欠損非ヒト動物作製方法も提供する。即ち本発明のSMP30欠損非ヒト動物作製方法の第1の態様は、染色体SMP30遺伝子の少なくとも一部のDNA配列を欠失させるか、他の配列を挿入するか、若しくは少なくとも一部のDNA配列を他の配列で置換するか、又はこれらの組み合わせによって機能が欠損した変異型SMP30遺伝子を作製することを特徴とする、SMP30欠損動物の作製方法である。

本発明のSMP30欠損非ヒト動物作製方法の第2の態様は、染色体SMP30遺伝子の発現の過程またはSMP30のプロセッシングの過程に関わる遺伝子産物をコードする遺伝子において、少なくとも一部のDNA配列を欠失させるか、他の配列を挿入するか、若しくは少なくとも一部のDNA配列を他の配列で置換するか、又はこれらの組み合わせによる、SMP30欠損動物の作製方法である。

さらに本発明は、種間の相同性が高く、抗体が作製できないかあるいは作製しても抗体価の高い抗体が得られない場合の、抗体作製方法を提供する。即ち本発明における抗体作製方法の第1の態様は、SMP30の欠損非ヒト動物を免疫することを特徴とする、SMP30またはその一部を抗原とする抗SMP30抗体の作製方法である。

本発明の抗体作製方法の第2の態様は、上記抗体が、上記のSMP30欠損非ヒト動物のうちのいずれかをを用いて上記抗体のいずれかを作製する、抗SMP30抗体の作製方法である。

本発明の抗体作製方法の第3の態様は、上記方法によって作製された抗体が、ポリクロー

ナル抗体又はモノクローナル抗体若しくはその抗原結合性フラグメントであることを特徴とする抗SMP 30抗体の作製方法である。

本発明の抗体の作製方法のその他の態様は、上記方法によって作製された抗体が、ヒトSMP 30またはその一部に反応を示す、モノクローナル抗体又はその抗原結合性フラグメントであることを特徴とする作製方法である。

本発明のハイブリドーマ作製方法の第1の態様は、SMP 30欠損非ヒト動物を免疫してSMP 30またはその一部を抗原とする抗SMP 30抗体産生ハイブリドーマを作製する、ハイブリドーマ作製方法である。

本発明のハイブリドーマ作製方法の第2の態様は、上記ハイブリドーマの産生する抗SMP 30抗体が、上記に記載の抗体のいずれかである、ハイブリドーマの作製方法である。

また、本発明は、SMP 30に限らず、種間で高い相同性を示すタンパク質を抗原とする抗体の産生の一般的方法も示す。即ち、本発明の抗体の作製方法の他の態様は、脊椎動物間のアミノ酸の相同性が40%以上であるタンパク質を抗原とする抗体又はその抗原結合性フラグメントの作製方法であって、当該抗原の欠損動物を免疫して当該抗原に対する抗体又はその抗原結合性フラグメントを作製する、抗体の作製方法である。本発明は脊椎動物間のアミノ酸の相同性が50%以上の場合に特に有効である。

さらに、本発明の抗体の作製方法の他の態様は、哺乳動物間のアミノ酸の相同性が50%以上であるタンパク質を抗原とする抗体又はその抗原結合性フラグメントの作製方法であって、当該抗原の欠損動物を免疫して当該抗原に対する抗体又はその抗原結合性フラグメントを作製する、抗体の作製方法である。本発明は哺乳動物間のアミノ酸の相同性が60%以上の場合に特に有効である。哺乳動物間の相同性が60%以上の場合、実験等に用いられるげっ歯類その他では相同性がさらに高く、ほとんどの場合が抗体作製困難となるため、本発明は種間で保存されているタンパク質の抗体を作製する方法として極めて有効な手段を提供するものである。

### 図面の簡単な説明

図1は、129/SvマウスよりクローニングしたSMP30遺伝子の概略図である。

図2は、ターゲッティングベクター作製に使用した、プロモーターを含むneo耐性遺伝子の概略図である。

図3は、ターゲッティングベクター作製の概念図である。

図4は、相同組換えを検出するPCRシステムの概略図である。

図5は、SMP30遺伝子欠損マウスの第一世代から第三世代までの遺伝子型及び表現型である。

### 発明を実施するための最良の形態

SMP30遺伝子については、前述のように、ヒト、マウス、ラット、ウサギ、ウシ、ニワトリ、カエル等からそのcDNAがクローニングされ、cDNA配列及びコード蛋白質(SMP30)のアミノ酸配列が報告されている(前述Fujitaら、またはMisawaらの論文)。またマウスでは染色体SMP30遺伝子の構造も報告されている(Fujitaら、Biochim Biophys 第1308巻、49～57、1996年)。これらのSMP30はすべて299アミノ酸からなり、約70%～92%の高い相同性を示し、特にマウスとヒトでは89%、マウスとラットでは94%と高値であった(Fujitaら、Biochim Biophys 第1308巻、49～57、1996年)。

本発明における、SMP30またはそれをコードするSMP30遺伝子は、既報のヒト、マウス、ラット、ウサギ、ウシ、ニワトリ等のSMP30のアミノ酸配列、SMP30遺伝子のcDNA配列またはジェノミックDNA配列と相同性を有するものであれば、既報の配列以外のものや、これらの動物由来以外のものも含まれる。このようなSMP30またはそれをコードするSMP30遺伝子としては、例えば(1)既報の、NCBIアクセス番号Q64374(European Molecular Biology Laboratory (EMB

L)に記載されたマウスのアミノ酸配列 (SEQ ID No: 1) を有する蛋白質またはそれをコードする遺伝子、(2) 既報の、NCBIアクセス番号Q64374 (EMBL)に記載されたマウスのアミノ酸配列 (SEQ ID No: 1) において、1もしくは数個のアミノ酸残基が付加、欠失もしくは置換されたアミノ酸を有する蛋白質またはそれをコードする遺伝子、が挙げられる。

ここでアミノ酸の付加、欠失、もしくは置換は、通常1～約90個、好ましくは1～約60個、より好ましくは1～約30個、さらに好ましくは1～約15個、またさらに好ましくは1～数個である。

また本発明におけるSMP30は、既報の、NCBIアクセス番号Q64374 (EMBL) (SEQ ID No: 1)に記載されたマウスのアミノ酸配列と通常70%以上、好ましくは80%以上、より好ましくは90%以上、さらに好ましくは95%以上のアミノ酸配列の相同性を有する。なお、アミノ酸配列の相同性は、FASTAのような周知のコンピューターソフトを用いて容易に算出することができ、このようなソフトはインターネットによっても利用に供されている。

また本発明におけるSMP30遺伝子cDNAは、NCBIアクセス番号U28937 (DDBJ) (SEQ ID No: 2)に記載されたcDNA配列と通常60%以上、好ましくは70%以上、より好ましくは80%以上、さらに好ましくは90%以上の塩基配列上の相同性を有する。

本発明において「SMP30の機能が欠損した非ヒト動物」(以下、SMP30欠損動物と称する。)とは、染色体上に導入された変異により、SMP30が産生されないか、あるいは機能が欠損した変異型SMP30を産生する非ヒト動物を意味する。SMP30の欠損は、機能が欠損した変異型SMP30遺伝子を有することに起因するのが最も一般的であり、遺伝子工学的にも手法が確立している。本発明においても、他の配列(遺伝子本来の配列と異なる配列)の挿入に

よる変異型SMP 30遺伝子を有するSMP 30欠損動物を、その実施の一例としてあげている。

ただしSMP 30の欠損は必ずしも染色体SMP 30遺伝子における変異に限定されるものではない。タンパク質が正常に機能しない原因は必ずしもそのタンパク質をコードする遺伝子に限らず、転写と翻訳を含めた一連の合成過程に欠陥がある場合も想定できるからである。特に異種配列導入後のスクリーニングを抗SMP 30抗体等を用いて、SMP 30の産生あるなしで行えば、目的とするタンパク質の遺伝子とはまったく異なる遺伝子を改変することによってSMP 30欠損の表現型が得られる可能性がある。

機能が欠損した変異型SMP 30遺伝子としては、変異のない正常遺伝子と比較して、遺伝子発現が抑制されるか、または遺伝子産物の活性が少なくとも一部失われた遺伝子が挙げられる。典型例としては、遺伝子発現が完全に抑制されるか、または遺伝子産物の活性が完全に消失した遺伝子が挙げられる。

本発明の動物としては、その構成細胞のすべてにおいて、変異型SMP 30遺伝子が染色体上で、ホモの状態で存在しているもの（ホモ欠損動物）、またはヘテロの状態で存在しているもの（ヘテロ欠損動物）が挙げられる。また、その構成細胞の一部のみにおいて変異型SMP 30遺伝子がホモまたはヘテロの状態が存在する、キメラ動物も挙げられる。

非ヒト動物としては、例えば、マウス、ラット、ウサギ、ブタなどの哺乳動物、ニワトリなどの鳥類、カエルなどの両生類、などが挙げられる。これらのうちマウスやラットなどのげっ歯類動物は、ライフサイクルが短く繁殖が容易であり、遺伝的欠損動物の作製技術も確立していることなどの点で有利であるため、好ましい。

本発明のSMP 30欠損動物は、最も一般的な方法として、染色体のSMP 3

0 遺伝子に人為的に変異を導入し、その機能を欠損させることにより作製できる。具体的には、染色体上の SMP 3 0 遺伝子の少なくとも一部の DNA 配列を欠失させるか、他の配列を挿入するか、あるいは他の配列に置換することにより、SMP 3 0 遺伝子の機能を欠損させることができる。

欠失または他の配列を挿入・置換させる部位（ターゲット部位）は、SMP 3 0 遺伝子内のプロモーター領域、非翻訳領域、翻訳領域などのいずれであってもよい。これらのどの部分をターゲットとするかによって、SMP 3 0 遺伝子の転写産物（mRNA）が産生されなくなったり、転写産物を不安定化したりすることが可能である。また活性の失った SMP 3 0（蛋白質）やその断片を産生させることもできる。遺伝子の機能を完全に欠損させるには、プロモーター領域または翻訳領域をターゲットとすることが好ましい。

前記のような染色体上の SMP 3 0 遺伝子への変異導入は、遺伝子相同組換えにより実施できる。具体的には、例えば以下のように実施できる。

まず相同組換えに使用するターゲッティングベクターを作製する。ターゲッティングベクターには相同組換えによって置き換える、染色体由来の SMP 3 0 遺伝子の全部または一部と、マーカー遺伝子を含む。マーカー遺伝子上流と下流は、SMP 3 0 遺伝子の、挿入しようとする部分と相同な塩基配列部位によって囲まれる。

前記 SMP 3 0 遺伝子の全部または一部は、SMP 3 0 遺伝子を欠損させようとする動物種の染色体 DNA から SMP 3 0 遺伝子領域を単離して得られる。例えば定法によりその動物種の染色体 DNA（ジェノミック DNA）ライブラリーから、PCR 法（Polymerase Chain Reaction）、コロニーハイブリダイゼーション法、ブランクハイブリダイゼーション法、あるいはこれらの組み合わせにより、SMP 3 0 遺伝子のクローンを得ることができる。

ターゲッティングベクターには、マーカー遺伝子を挿入する。これは、ベクタ

一を細胞内に導入する際に、導入した細胞のみを選択するためのものである。このようなマーカー遺伝子としては、例えばネオマイシン耐性遺伝子 (neo)、ジフテリアトキシンAフラグメント遺伝子(DT-A)、ハイグロマイシン耐性遺伝子、テトラサイクリン耐性遺伝子、ストレプトマイシン耐性遺伝子、ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ遺伝子 (HSV-tk) 等、通常の薬剤耐性選択に用いる遺伝子を用いることができる。例えばネオマイシン耐性遺伝子が導入された細胞は、G 4 1 8などのネオマイシンに耐性を示すので、細胞の培養の際にネオマイシンを加える事によって、ベクターを含む細胞のみを選択できる。

また、SMP 3 0 遺伝子にレポーター遺伝子を挿入してもよい。これはターゲッティングベクターを導入した細胞内や、目的とする SMP 3 0 欠損動物の細胞内での SMP 3 0 遺伝子の転写活性をモニターするためのものである。この場合、挿入する非相同的配列部分に SMP 3 0 遺伝子とレポーター遺伝子の翻訳フレームが一致するように設計する。レポーター遺伝子は一般に用いられるものでよく、例えば lacZ (大腸菌-ガラクトシダーゼ) 遺伝子、CAT (クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ) 遺伝子、GUS ( $\beta$ -グルコニダーゼ) 遺伝子、ルシフェラーゼ遺伝子、エクオリン遺伝子、タウマリン遺伝子等を用いることができる。

さらにベクターが細胞内で非相同的組換えを起こした場合に細胞が死滅するような DT-A カセットを加えることも可能である。これによってターゲッティングベクターが目的の染色体領域に組み込まれた細胞を、通常より高い割合で選択することができる。

相同組換え用ターゲッティングベクターは以下のように構築する。即ち、前述のようにして単離した染色体由来 SMP 3 0 を適当な制限酵素で切断して得られた断片を、マーカー遺伝子、レポーター遺伝子、DT-A カセット等と適当な順序で連結させる。この時に必要ならば合成したリンカーDNAを用いてもよい。また、単離した染色体由来 SMP 3 0 遺伝子は、必要に応じてPCR法等により断片の一部を増幅することも可能である。相同組換え用ターゲッティングベクタ

一は、通常のDNA組換え技術により容易に作製することができる。

次に、相同組換え用ターゲッティングベクターを、直線化して、適当な細胞へ導入する。細胞は、潜在的に全ての細胞に分化し得るものを用いる。例えばマウスの場合、受精卵や初期胚、あるいはES細胞（胚性幹細胞）のような培養細胞であるが、このうちES細胞は技術的にも確立していることから最も好ましい。導入する方法は、通常の方法、例えばエレクトロポレーション法、マイクロインジェクション法等が用いられる。

ターゲッティングベクターが取り込まれた細胞は、ベクター内のマーカー遺伝子の発現によって選択できる。例えばマーカーが薬剤耐性遺伝子であれば、適当な期間、薬剤存在下で培養することにより選択できる。選択された細胞内の相同的組換えはPCR法やサザンハイブリダイゼーションによって確認できる。DT-Aカセットを挿入した場合は、通常よりも相同的組換えの割合が上昇するが、いずれにしても挿入確認の際に組換えの部位を確認する必要がある。

組換えによって目的DNAが挿入した細胞（例えばES細胞）を8細胞期の宿主胚に凝集法により注入し、胚盤胞期まで発生させた後、これを偽妊娠動物の子宮に移植してキメラの産仔を得る。

これらのキメラ動物の産仔で生殖細胞がES細胞に由来するものを野生型と退交配してSMP30遺伝子ヘテロ欠損動物を得ることができる。また得られたSMP30ヘテロ欠損動物同士を交配してホモ欠損とすることも可能である。これらの動物の遺伝子型は、その動物の体の一部（例えば尾部先端）から得た染色体DNAについて、PCR法やサザンハイブリダイゼーション法等により、解析し確認できる。

本発明の動物は、正常な動物と同様な方法により飼育することができる

SMP30欠損非ヒト動物は、SMP30欠損による疾病とその治療法の解明に用いることができる。

また、本発明のSMP30欠損非ヒト動物を用いることにより、従来は不可能



であった抗原提供動物と抗体産生動物を組み合わせることや、あらゆる種に有効な、反応性の高い抗SMP30抗体またはそのフラグメントを作製することが可能となる（ここでいう「フラグメント」とは、抗原結合性フラグメントをいい、抗原に非結合性のフラグメント（例えばFcフラグメント）は含まない）。

例えば、抗体の作製にはマウスやラット等のげっ歯類を用いるのが一般的であるが、前述のように、SMP30のアミノ酸配列はヒト、マウス、ラット、ウサギにおいて、非常に高い相同性を維持しており（Fujitaら、Mech Ageing Dev、第107巻、271-280、1999年）（Misawaら、Int J Mol Med、第6巻、191-196、2000年）、これらのげっ歯類に異種SMP30を注入しても、異種タンパク質とは認識しないので、反応性の高い抗SMP30抗体、特にモノクローナル抗体を作製するのは困難であった。

しかしこの問題は本発明であるSMP30欠損動物を用いることで解決できる。例えばSMP30欠損マウスに任意の動物種のSMP30を免疫することによって、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体のいずれも作成可能となる。さらに従来ではほとんど不可能であったような相同性の高い抗原提供動物と抗体産生動物の組み合わせ、例えばマウスに抗ラットSMP30を産生させることも可能となり、相同性の割合にかかわらず自由に組み合わせて抗体を作成することができる。抗体が複数の抗原を共通抗原として認識しているかどうかは、種の異なる2種類以上のSMP30と反応するかどうかを確認することで簡単に判断できる。

抗原として用いるSMP30は、既報のヒト、マウス、ラット、ウサギ、ウシ、ニワトリ等のSMP30のアミノ酸配列と相同性を有するものであれば、既報の配列以外のものや、これらの動物由来以外のもの、さらにアミノ酸が付加、置換、欠失、挿入により修飾されたものも含まれる。このようなSMP30は、例えば（1）既報の、NCBIアクセス番号D31662に記載されたラットのアミノ酸配列、（2）既報の、NCBIアクセス番号D31662に記載されたラットのアミノ酸配列において、1もしくは数個のアミノ酸残基が付加、置換、欠失もしくは挿入されたアミノ酸を有する蛋白質が挙げられる。

ここでアミノ酸の付加、置換、欠失、もしくは挿入は、通常1～約90個、好ましくは1～約60個、より好ましくは1～約30個、さらに好ましくは1～約15個、またさらに好ましくは1～数個である。

また本発明において抗原として用いるSMP30は、既報の配列、例えば上記のラットの配列や、カエル（NCBIアクセス番号AB033368）、マウス（Q64374又はD86217）、ウシ（AB035446）、ヒト（D31815）等のアミノ酸配列と通常70%以上、好ましくは80%以上、より好ましくは90%以上、さらに好ましくは95%以上のアミノ酸配列の相同性を有する。

いわゆる「相同性が高い」とはどのくらいの割合を指すのかは多分に研究者の主観に委ねられているが、一般にはアミノ酸レベルで70%以上相同なタンパク質同士は「進化的に非常によく保存されている」、即ち相同性が高いと表現される（Shcherban ABら、Genetica、第110巻、43-53、2000年、Swidzinski JAら、Genome、第44巻、394-400、2001年）。また、実際の抗体作成において現在最も頻繁に使用されているげっ歯類は、例えばSMP30については、カエルとラットの相同性は60.1%であるが、ラットとマウスの間では相同性93.8%であるように（NCBIデータ）、互いに進化的に近いので、一般にさらに高い相同性を示すことが予想される。

したがって、現実の実験工程においては、哺乳動物間では50%以上、脊椎動物としては40%以上の相同性を示すタンパク質において、抗体作製が困難になると考えられる。相同性が哺乳動物間で60%以上、脊椎動物間で50%以上となると、確率的に抗体の作製はかなり難しく、実験ではもっぱらポリクローナル抗体で、しかも感度の低いものを使わざるを得ない。

そこでSMP30に限らず、相同性の高いタンパク質の抗体作製一般において、欠損動物を作成し、抗体作製に用いることは極めて有効である。欠損動物にとって当該欠損タンパク質は完全に異種タンパク質であるので、タンパク配列相同性のある部分もエピトープとすることができるからである。

本発明は脊椎動物間のアミノ酸の相同性が40%以上の場合に有効である。また、本発明は脊椎動物間のアミノ酸の相同性が50%以上の場合にはより有効で、さらに相同性が60%以上の場合には特に有効である。また、本発明は哺乳動物間のアミノ酸の相同性が50%以上の場合に有効で、アミノ酸の相同性が60%以上の場合にはより有効である。さらに哺乳動物間のアミノ酸の相同性が70%以上の場合には特に有効である。即ち脊椎動物間の相同性が40%以上の場合あるいは哺乳動物間の相同性が50%以上の場合には、実験等に用いられるげっ歯類その他では相同性がさらに高く、ほとんどの場合が抗体作製困難となるため、本発明は種間で保存されているタンパク質の抗体を作製する方法として極めて有効な手段を提供するものである。

またこの抗体は従来のもものより高い汎用性を持つことが予想される。即ち作成した抗体が、異種間で保存されているアミノ酸配列部分をエピトープとする抗体であれば、この抗体1種類のみで、あらゆる種の同種タンパク質に反応することになる。このことは、複数のエピトープに反応するポリクローナル抗体の場合にも、もちろん該当するが、モノクローナル抗体の作成においても、このような広い反応性を持つ抗体産生細胞を選択することが可能である。

また免疫される動物にとって、その抗原がまったくの異物であることから、非常に感度の高いポリクローナル抗体が産生されることが予想される。即ち抗原として体内に導入されたタンパク質のあらゆる部分がエピトープとして有効であり、それらに反応する無数の抗体の組合せがより強い反応を示すからである。さらにこのことはモノクローナル抗体の作製においても、有利に作用する。ポリクローナル抗体が十分に反応性を示さない場合は、有効なハイブリドーマを作製することが困難であることは研究者には広く知られているが、逆に反応性の高い場合は、

様々なエピトープに基づいた多様なハイブリドーマが効率よく作製されることが期待できる。

一般に遺伝子欠損動物では、反応性の高い抗体は、遺伝子を欠損させたES細胞から得られた第1世代の次々世代（第3世代）で作製が可能となる（図5）。例えばマウスではSMP30遺伝子はX染色体上に位置するので、第1世代のSMP30欠損マウスの雄は遺伝子型（Y/−）、雌の遺伝子型はほとんどの場合ヘテロ（+/−）となる。この第1世代の（Y/−）の雄はSMP30欠損表現型を示すが、母親の胎内で免疫寛容性を獲得しているので、外部からのSMP30を異種タンパク質と認識しない。また次世代のマウスは雄（Y/−）、ホモ欠損の雌（−/−）のいずれもが、母親がヘテロ（+/−）であることから、やはり母親の胎内で免疫寛容性を獲得してしまい、実際に有効性の高い抗体をつくるのは、SMP30について自己生産能を失った、これら第2世代マウスを親として生まれた第3世代であることが予想される。

このようにして得られた抗体は、例えば体液・組織中のSMP30量の測定に用いられる。血液、尿、唾液、胃液、胆汁、髄液等、のあらゆる体液や組織にはSMP30が存在しており、各種の臓器障害により量が増減する。これらは抗SMP30抗体を用いて測定することができる。測定方法としては、ELISAやサンドイッチ法等、一般的測定方法のいずれを用いてもよい。開発された測定方法は、前述のとおり種を超えて有効であり、例えばヒトのみならず、家畜、ペット、実験動物等に用いることも可能である。

また前述の抗体は、定法により、病理学的組織診断において免疫組織学的に利用することが可能である。

SMP30は、ほぼ全身の臓器に発現しているが、特に薬剤障害の主要な標的臓器である肝細胞及び腎尿細管上皮細胞には強い発現がある。SMP欠損動物においてはこれらの標的細胞が薬物障害に対して脆弱となるので、医薬品のこれら

の臓器に対する副作用を高感度で検出することが可能である。SMP 30が欠損した動物は、医薬品開発における副作用の高感度検出モデルとして有効である。

動物実験において、酸化ストレスによってSMP 30の発現が低下することが知られている。またSMP 30の発現は加齢に伴い減少し、その結果血中SMP 30蛋白質量も低下することから（Fujitaら、Biochim Biophys Acta、第1308巻、49～57、1996年）、酸化ストレスによって細胞の老化が亢進していることが推定される。このことから、例えば血中SMP 30蛋白質量を測定することにより、SMP 30の発現の低下を、老化度のパラメーターとして用いることができる。

SMP 30欠損動物の表皮細胞ではフィラグリンの分解が低下し、保水性が大きい遊離アミノ酸量が減少する。SMP 30測定法やSMP 30欠損動物等を組合せて、皮膚の保水性を亢進させる医薬品や化粧品の開発が可能である。

肝癌細胞にSMP 30 cDNAを移入することによって癌細胞の分化が生じる。SMP 30欠損動物及び抗SMP 30抗体を用いて、SMP 30抑制による癌細胞の分化・誘導の制御、即ち、癌細胞の保存的療法に応用が可能となる。

以下、実施例を挙げて本発明を具体的に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

## 実施例

### 実施例1 SMP 30遺伝子欠損動物作製用DNA断片の調製

ラットのSMP 30のcDNAであるλSMP 8（NCBIアクセス番号；X69021（DDBJ））（Fujitaら、Biochim Biophys Acta、第1132巻、297～305、1992年）をEcoRI/PstIによって制限酵素処理して得られた、ラットSMP 30 cDNAの全コーディング領域を含む、

約1 KbpのDNA断片をプローブとして、129/SV系統マウス由来のゲノムライブラリー (Stratagene社製、λファージ) についてブランクハイブリダイゼーションにより、マウスSMP30遺伝子 (約14 Kbp) をクローニングした (図1)。これを制限酵素C1aIで消化し、第1エクソンと第2エクソンを含む約6 Kbpの断片を含む約14 KbpのC1aI断片 (長腕) を得た。

さらにC57BL/6マウス由来ジェノミックDNAのpGM6SMP30 (NCBIアクセス番号; U32170 (DDBJ)) (Fujitaら、Biochim Biophys 第1308巻、49～57、1996年) を鋳型として、センスプライマー (SEQ ID No: 3) を第3エクソンのC1aIから3'方向に、その下流約2 Kbp部位にアンチセンスプライマー (SEQ ID No: 4) を5'方向に設定し、約2 Kbp断片 (短腕) をPCR法により調製した (図1)。なお上記鋳型に用いたDNA断片の配列は決定されていないので、その対応する部分を含む領域のみDNA配列を決定し、さらにその5'端をSalI断端となるように配列を加えて、アンチセンスプライマーを設計した。

次に3804bpのpMC1neoプラスミド (Stratagene社製) を、XhoIとSalIで消化し、Neo耐性遺伝子とプロモーターを含む、1083bpの断片を得た (図2)。この断片の5'端をアダプターによりSalI断端に改変した。

以上3つのDNA断片、即ち、SMP30の長腕と短腕、Neo耐性遺伝子をプラスミドpBluescriptSK+内のマルチクローニングサイトのC1aIとSalIの間に長腕、neo、短腕の順に組み込んだ (図3A、B)。

次に、このプラスミドから制限酵素NotIとXhoIにより得られる約8.5 KbpのDNA断片を、プラスミドpMCDT-A (A+T/pau) (ライフテックオリエント社製、Yagiら、Anal Biochem、第214巻、77～86、1993年) のNotI/XhoIの間に挿入した (図3C)。その結果図3D

に示すターゲッティングベクターが得られた。これを通常の方法により大量に調製し、Not Iで切断して、SMP 30の相同組換えに用いる、直線化したDNAを得た(図3E)。

#### 実施例2 ES細胞を用いたSMP 30遺伝子の相同組換え

マウス胚性幹細胞(ES細胞)(TT2細胞株、XY染色体)(Yagira、Anal Biochem、第214巻、70~76、1993年)を定法により培養し、エレクトロポレーション法により上記のNot I処理により直線化したターゲッティングベクターをES細胞に導入した。エレクトロポレーション実施後G418を含有する培地中で選別的に培養し、502個のネオマイシン耐性クローン(ターゲッティングベクターが導入されたES細胞)を取得した。

これら502個のクローンについて、サザンハイブリダイゼーション法により、相同組換えの有無を確認した。即ち、抽出した細胞DNAを、EcoRIにより切断し、電気泳動の後メンブレンに移したDNA断片について<sup>32</sup>P標識Fプローブでハイブリダイゼーションを行った。野生型(WT)では7.5Kbpのバンドが検出されるのに対して相同組換えが生じた細胞(KO)では7Kbpであった(図4)。これは第3エクソン内に挿入されたNeo耐性遺伝子内にEcoRI切断部位が存在するためである。またこのときに使用したFプローブは、マウスSMP 30遺伝子の第3エクソンと第4エクソン間から抽出した0.52Kbpの断片である(図1)。502個のネオマイシン耐性クローンを解析した結果、3個(#41、#60、#169)の相同組換えを生じた細胞を検出した。

#### 実施例3 SMP 30欠損マウスの樹立

妊娠マウスから8細胞期胚を採取するために雌雄のICRマウスを交配させ、プラグを確認し、妊娠したと思われる雌マウスの子宮から杯盤胞を摘出し、8細胞期胚を得て、SMP 30遺伝子の相同組換えが生じたES細胞(#41)を凝集法により胚表面に吸着させた。その後さらに1日培養して杯盤胞に発生したものを仮親の子宮に移植した。出生したキメラマウスの遺伝子型をサザンハイブリ

ダイゼーション、PCR法により確認した。具体的には前述のクローンの確認と同様、マウス肝臓から抽出したDNAを制限酵素EcoRIで切断し、7Kbpの断片を確認した。またPCR法による解析では、図4に示すように、野生型マウスではTS3 (SEQ ID No: 5) とTA4 (SEQ ID No: 6) を一組のプライマーとして280bpのバンドが、欠損マウスではNEO1 (SEQ ID No: 7) とTA4の組み合わせによる323bpのバンド及びTS3とTA4の組み合わせによる1363bpのバンドが認められた。

SMP30遺伝子において相同組換えが生じたマウスと生じていないマウスそれぞれの肝臓におけるSMP30遺伝子の発現をウエスタンブロット法により解析した。ラットSMP30を家兎に免疫して作製したポリクローナル抗体を用いてウエスタンブロットを行うと、野生型マウスではSMP30の分子量に該当する約30KDaの部位にバンドが認められたが、欠損マウスでは認められなかった。この結果から、SMP30遺伝子の相同組換えにより、SMP30欠損マウスが樹立したことを確認した。

#### 実施例4 SMP30欠損マウスにおける抗SMP30抗体産生の有効性の確認

得られたSMP30欠損マウスを用いて、反応性の高い抗SMP30ポリクローナル抗体が得られるかどうかの確認を行った。ポリクローナル抗体作製法は生物学の分野では広く一般的に知られた技術である。用いたマウスは、第1世代のM1、F1とこれらを両親して生まれたM2とF2、さらにこれらを両親としたM3の5種類のマウスで、遺伝子型は、M1 (Y/-)、F1 (+/-)、M2 (Y/-)、F2 (-/-)、M3 (Y/-) である (SMP30はX染色体上に位置するので、オスの欠損マウスの遺伝子型はY/-となる)。これらの表現型はヘテロのF1のみがSMP30を発現し、その他はすべてSMP30欠損で、遺伝子型と一致した。

これらのマウスに精製ラットSMP30で作製した免疫用抗原エマルジョン



を皮下注射し、その後2週間おきに3回追加免疫した。その後得られた血清をマウスSMP30を用いてウエスタンブロットを行ったところM3に強いバンドが検出された。これらの相対的強度は以下の表のとおりであり、当初より予想された理論値と完全に一致した。

マウス	バンド強度
M1 SMP30-KO ♂ (Y/-)	—
F1 SMP30-KO ♀ (+/-)	—
M2 SMP30-KO ♂ (Y/-)	+/-
F2 SMP30-KO ♀ (-/-)	+
M3 SMP30-KO ♂ (Y/-)	5+

#### 実施例5 モノクローナル抗体の作製とセルラインの確立

##### (1) ミエローマ細胞の調整

ミエローマ細胞PX63Ag8.653をAmerican Type Culture Collection (Rockville, MD, 米国) より入手し、当日 $5-10 \times 10^7$ 個の細胞が得られるように融合の1週間前に培養を開始した。当日細胞を $4^{\circ}\text{C}$  1200 rpmで5分間遠心し、沈殿にイーグルMEMを加え再度懸濁と遠心を行い、イーグルMEM 20 mlを加え懸濁させ細胞数を数えた。

##### (2) 脾細胞の調整

免疫したマウスから取り出した脾臓をステンレスメッシュ上において細胞をかき出し、イーグルMEM (Nissui) でステンレスメッシュを洗って細胞を培養皿に落とした。グラスウールで細胞懸濁液を濾過し、濾液を $4^{\circ}\text{C}$  1000 rpmで5分間遠心して細胞を回収し、そこに40 mlのイーグルMEMを加え細胞

数を数えた。

### (3) 細胞融合

ミエローマ細胞と脾細胞が1対2になるように混ぜ、4℃1000rpmで5分間遠心した。上清を除きPEG-イーグルMEM1mlを徐々に加え細胞をほぐし、その後37℃のイーグルMEM30mlを徐々に添加した。遠心(800rpm、室温、5分)後上清を除き、37℃の10%FCS+RPMI-1640を10ml加え、37℃で60分放置後蓋をしめて天地にゆっくりと振って沈殿をほぐした。10%FCS+RPMI-1640を40ml加え、25mlずつ分注し、10%FCS+RPMI-1640を加え50mlとした。先端をカットしたクリスタルチップで96穴プレートに100μlずつまき、37℃で一晩培養した。

### (4) HAT選択

融合の翌日、10%FCS+RPMI-1640に50xHAT(SIGMA社)を加え2xHATを作製し、各ウェルに100μlずつ加えた。その後2、3日おきに100μlずつ培地を交換し、融合10日後からは2xHT/10%FCS+RPMI-1640で培養した。

### (5) スクリーニング及びクローニング

融合10日後からマウス肝臓SMP30を抗原としたELISA法によりスクリーニングを開始した。得られた陽性コロニーを限外希釈法によりクローニングした。即ち、ウェル当たり0.3細胞になるようにハイブリドーマを希釈して10日間培養し、再度ELISA法で陽性コロニーをスクリーニングした。この操作を再度行い、20個の抗SMP30抗体産生クローンを得た。

### 実施例6 モノクローナル抗体の反応性の確認

約 $2 \times 10^7$ 細胞/mlの前述のモノクローナル抗体産生細胞をSCIDマウス(重度免疫不全マウス)の腹腔内に投与した。2週間後腹水を採取し、30%硫

安沈殿及びPBSによる透析を行い、マウス、ラット、ヒト、ウサギ、カエルの肝臓細胞内SMP30との反応性をウエスタンブロッティングで確認したところ、これらすべてのSMP30に反応することが示され、種間で高度に保存されている部位に対しても反応していることが示唆された。通常のマウスを用いた場合に得られる抗体は、一般に自己のSMP30アミノ酸配列と異なった部位をエピトープとするものであることから、上記モノクローナル抗体はSMP30欠損マウスを用いたが故に得られた抗体であることが推定された。

本発明のSMP30の機能が欠損した動物は、SMP30の生物学的機能の解析、疾病との関連、治療方法の探索に有用である。SMP30は加齢に伴い全身の臓器で減少することから、加齢に伴う疾患の発生机序の解明にも有用である。また肝細胞等が脆弱なため、新薬の副作用スクリーニングとして使用できる。さらにSMP30欠損動物を用いて製作した抗SMP30抗体は、野生型を用いた場合より反応性が高く、種を超えて有効であり、SMP30の測定法の開発その他に広く応用できる。

## 請求の範囲

1. SMP 30の機能が欠損したSMP 30欠損非ヒト動物。
2. 前記SMP 30の機能の欠損が、染色体SMP 30遺伝子において、少なくとも一部のDNA配列を欠失させるか、他の配列を挿入するか、若しくは少なくとも一部のDNA配列を他の配列へ置換するか、又はこれらの組み合わせによるものであることを特徴とする、請求項1に記載のSMP 30欠損非ヒト動物。
3. 前記SMP 30の機能の欠損が、染色体SMP 30遺伝子の発現の過程またはSMP 30のプロセッシングの過程に関わる遺伝子産物をコードする遺伝子において、少なくとも一部のDNA配列を欠失させるか、他の配列を挿入するか、若しくは少なくとも一部のDNA配列を他の配列に置換するか、又はこれらの組み合わせによるものであることを特徴とする、請求項1に記載のSMP 30欠損非ヒト動物。
4. 前記他の配列が薬剤耐性遺伝子であることを特徴とする、請求項2または3に記載のSMP 30欠損非ヒト動物。
5. 前記薬剤耐性遺伝子が、ネオマイシン耐性遺伝子で、かつ挿入部位が染色体SMP 30遺伝子のエキソンであることを特徴とする、請求項4に記載のSMP 30欠損非ヒト動物。
6. 前記SMP 30欠損非ヒト動物が哺乳類であることを特徴とする請求項1から5のいずれか1項に記載のSMP 30欠損非ヒト動物。
7. 前記SMP 30欠損非ヒト動物がげっ歯類であることを特徴とする、請求項1から6のいずれか1項に記載のSMP 30欠損非ヒト動物。
8. 前記SMP 30欠損非ヒト動物がマウスであることを特徴とする、請求項1から7のいずれか1項に記載のSMP 30欠損非ヒト動物。
9. SMP 30欠損非ヒト動物をSMP 30で免疫して得られた、SMP 30又はその一部ペプチドを抗原とする抗体。
10. 請求項1から8のいずれか1項に記載のSMP 30欠損非ヒト動物を免疫して得られた、SMP 30又はその一部ペプチドを抗原とする抗体。
11. 脊椎動物のSMP 30若しくはその一部ペプチド又は脊椎動物の一部のSMP 30若しくはその一部ペプチドを共通抗原とする抗体。

12. 前記脊椎動物が、哺乳動物であることを特徴とする、請求項11に記載の抗体。

13. マウス、ラット、ヒト、ウサギ、ウシ、イヌ、ブタ、及びカエルのうちいずれか1種のSMP30若しくはその一部ペプチドで免疫して得られた抗体で、マウス、ラット、ヒト、ウサギ、ウシ、イヌ、ブタ、及びカエルすべての、若しくはこれらのうちの2種類以上の、SMP30若しくはその一部ペプチドを共通抗原とすることを特徴とする抗体。

14. ラットSMP30をSMP30欠損マウスに免疫して得られた、マウス、ラット、ヒト、ウサギ、ウシ、イヌ、ブタ、及びカエルすべてのSMP30若しくはその一部ペプチドを共通抗原とすることを特徴とする抗体。

15. 前記抗体が、アミノ酸の付加、置換、欠失、挿入により修飾されたSMP30で免疫して得られたことを特徴とする、請求項9から14のいずれか1項に記載の抗体。

16. 前記抗体が、ポリクローナル抗体であることを特徴とする、請求項9から15のいずれか1項に記載の抗体。

17. 前記抗体が、モノクローナル抗体又はその抗原結合性フラグメントであることを特徴とする、請求項9から15のいずれか1項に記載の抗体。

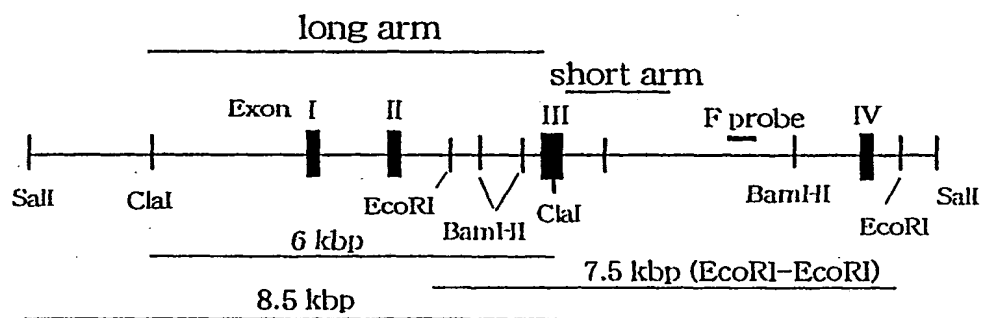
18. 染色体SMP30遺伝子において、少なくとも一部のDNA配列を欠失させるか、他の配列を挿入するか、若しくは少なくとも一部のDNA配列を他の配列で置換するか、又はこれらの組み合わせによって機能が欠損した変異型SMP30遺伝子を作製することを特徴とする、SMP30欠損非ヒト動物の作製方法。

19. 染色体SMP30遺伝子の発現の過程またはSMP30のプロセッシングの過程に関わる遺伝子産物をコードする遺伝子において、少なくとも一部のDNA配列を欠失させるか、他の配列を挿入するか、若しくは少なくとも一部のDNA配列を他の配列で置換するか、又はこれらの組み合わせによる、SMP30欠損非ヒト動物の作製方法。

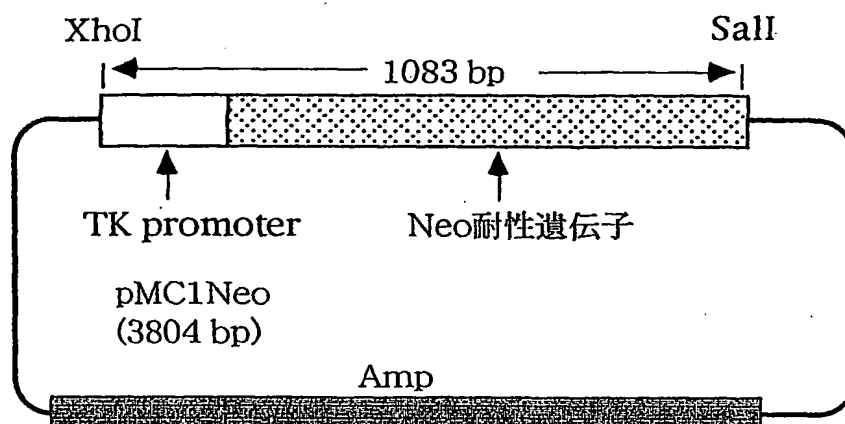
20. SMP30欠損非ヒト動物を免疫して、SMP30またはその一部を抗原とする抗SMP30抗体を作製する、抗体の作製方法。

21. 請求項20に記載の方法において作製する抗SMP30抗体が、請求項10から15のいずれか1項に記載の抗体である、抗体の作製方法。
22. 請求項20に記載の方法において作製する抗SMP30抗体が、請求項16または請求項17に記載の抗体であることを特徴とする、抗体の作製方法。
23. SMP30欠損非ヒト動物を免疫して、SMP30またはその一部を抗原とする抗SMP30抗体を産生するハイブリドーマを作製する、ハイブリドーマ作製方法。
24. 前記抗SMP抗体が、請求項9から15のいずれか1項に記載の抗体である、請求項23に記載のハイブリドーマ作製方法。
25. 脊椎動物間のアミノ酸の相同性が40%以上であるタンパク質を抗原とする抗体又はその抗原結合性フラグメントの作製方法であって、当該抗原の欠損動物を免疫して当該抗原に対する抗体又はその抗原結合性フラグメントを作製する、抗体の作製方法。
26. 哺乳動物間のアミノ酸の相同性が50%以上であるタンパク質を抗原とする抗体又はその抗原結合性フラグメントの作製方法であって、当該抗原の欠損動物を免疫して当該抗原に対する抗体又はその抗原結合性フラグメントを作製する、抗体の作製方法。

第1図

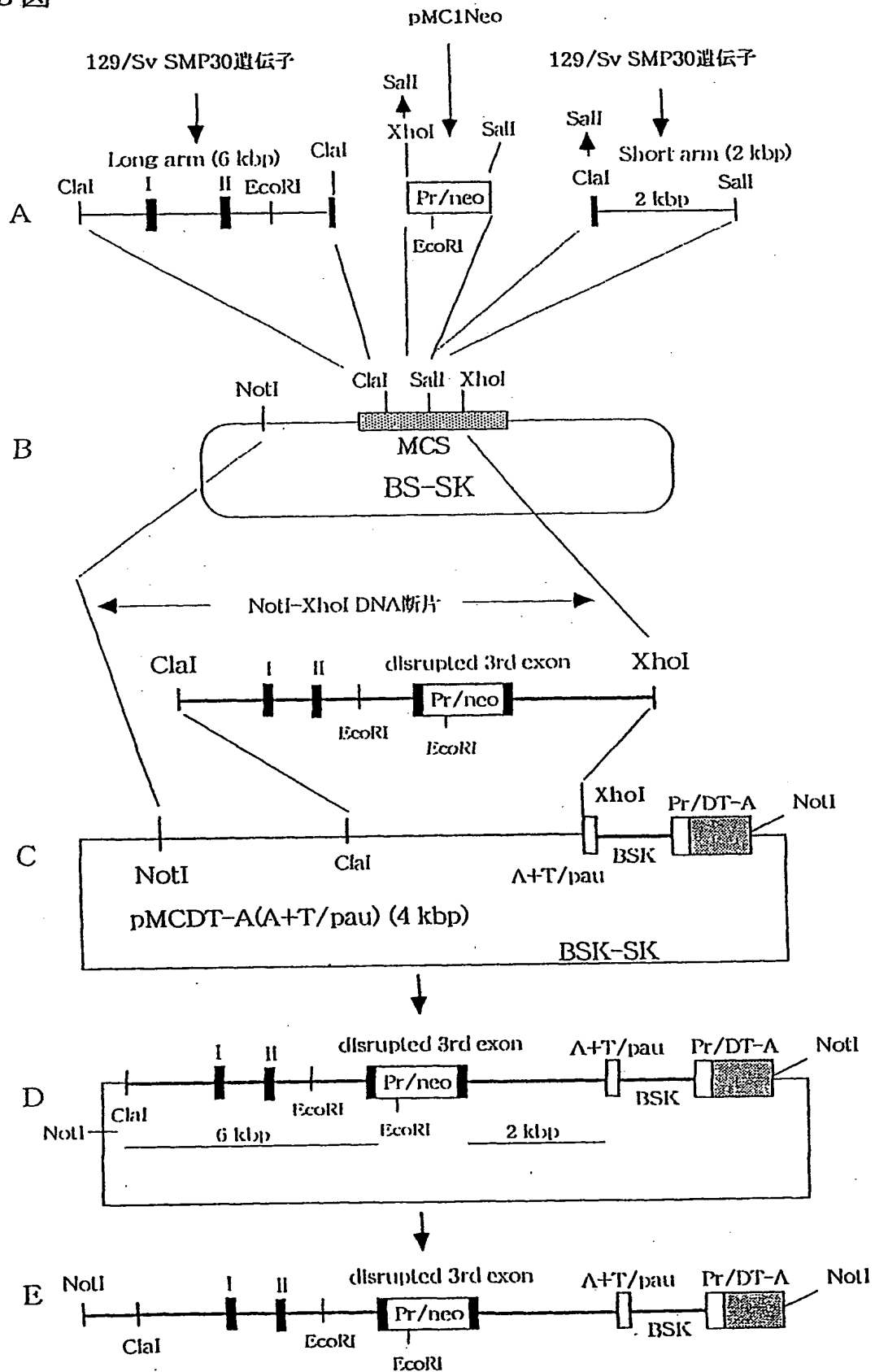


## 第2図

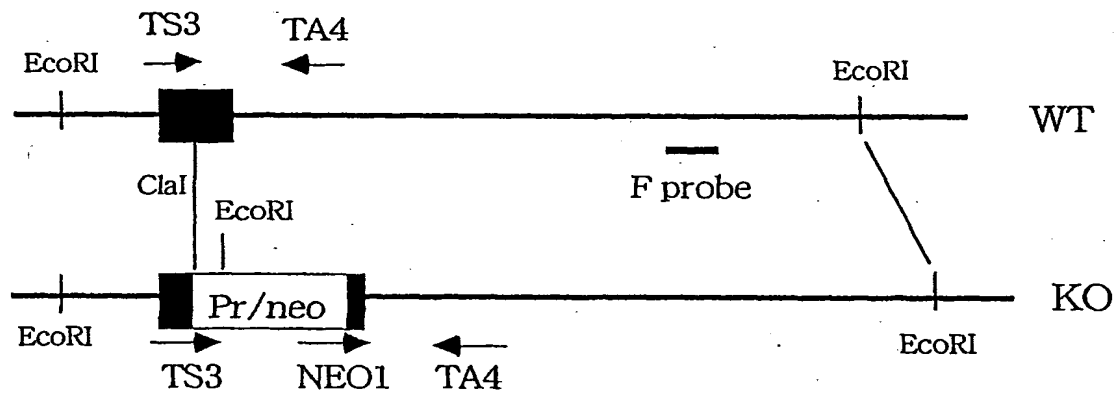




## 第3図



第4図

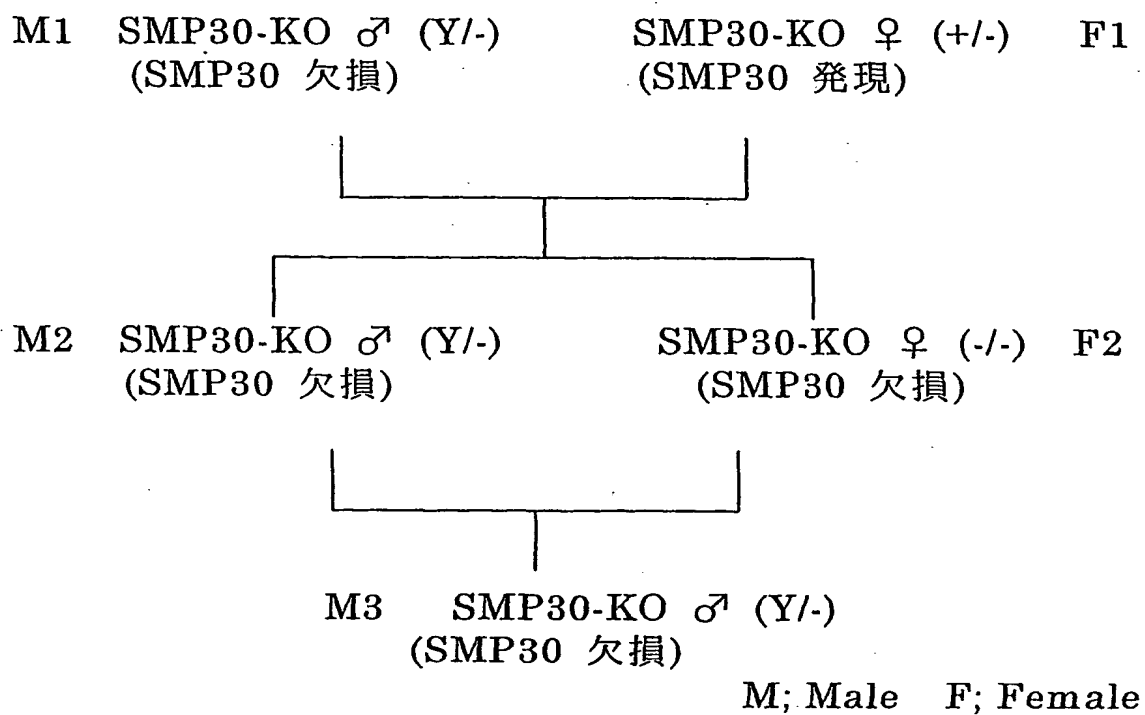


TS3 (21 bp): 5'-CTAGCCATGGTGGATGAAGAT-3'

NEO1 (30 bp): 5'-TCGTGCTTTACGGTATCGCCGCTCCCGATT-3'

TA4 (21 BP): 5'-CAAGTAACTCTAGGTATGGAC-3'

## 第5図



## SEQUENCE LISTING

&lt;110&gt; Naoki, MARUYAMA

Yasushi, KASAHARA

&lt;120&gt; Transgenic Animal and Antibody for Senescence Marker Protein-30

&lt;150&gt; Japan 2000-322234

&lt;151&gt; 2000-10-23

&lt;160&gt; 7

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 299

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;308&gt; Q64374

&lt;400&gt; 1

Met Ser Ser Ile Lys Val Glu Cys Val Leu Arg Glu Asn Tyr Arg Cys

1 5 10 15

Gly Glu Ser Pro Val Trp Glu Glu Ala Ser Gln Ser Leu Leu Phe Val

20 25 30

Asp Ile Pro Ser Lys Ile Ile Cys Arg Trp Asp Thr Val Ser Asn Gln

35 40 45

Val Gln Arg Val Ala Val Asp Ala Pro Val Ser Ser Val Ala Leu Arg

50 55 60

Gln Leu Gly Gly Tyr Val Ala Thr Ile Gly Thr Lys Phe Cys Ala Leu

65 70 75 80

Asn Trp Glu Asn Gln Ser Val Phe Val Leu Ala Met Val Asp Glu Asp

85 90 95

Lys Lys Asn Asn Arg Phe Asn Asp Gly Lys Val Asp Pro Ala Gly Arg

100 105 110

Tyr Phe Ala Gly Thr Met Ala Glu Glu Thr Ala Pro Ala Val Leu Glu

115 120 125

Arg His Gln Gly Ser Leu Tyr Ser Leu Phe Pro Asp His Ser Val Lys  
 130 135 140  
 Lys Tyr Phe Asp Gln Val Asp Ile Ser Asn Gly Leu Asp Trp Ser Leu  
 145 150 155 160  
 Asp His Lys Ile Phe Tyr Tyr Ile Asp Ser Leu Ser Tyr Thr Val Asp  
 165 170 175  
 Ala Phe Asp Tyr Asp Leu Gln Thr Gly Gln Ile Ser Asn Arg Arg Ile  
 180 185 190  
 Val Tyr Lys Met Glu Lys Asp Glu Gln Ile Pro Asp Gly Met Cys Ile  
 195 200 205  
 Asp Ala Glu Gly Lys Leu Trp Val Ala Cys Tyr Asn Gly Gly Arg Val  
 210 215 220  
 Ile Arg Leu Asp Pro Glu Thr Gly Lys Arg Leu Gln Thr Val Lys Leu  
 225 230 235 240  
 Pro Val Asp Lys Thr Thr Ser Cys Cys Phe Gly Gly Lys Asp Tyr Ser  
 245 250 255  
 Glu Met Tyr Val Thr Cys Ala Arg Asp Gly Leu Asn Ala Glu Gly Leu  
 260 265 270  
 Leu Arg Gln Pro Asp Ala Gly Asn Ile Phe Lys Ile Thr Gly Leu Gly  
 275 280 285  
 Val Lys Gly Ile Ala Pro Tyr Ser Tyr Ala Gly  
 290 295 299

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 1573

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;308&gt; U28973

&lt;400&gt; 2

gagtttttcc ttigtctact attttaaagg tatcttgaaa aaaaaaaact tcactgtcct 60

tttcctgtga cc atg tct tcc atc aaa gtt gaa tgt gtt tta cgg gag aac 111

Met Ser Ser Ile Lys Val Glu Cys Val Leu Arg Glu Asn

1 5 10

tac agg tgt ggg gag tct cct gta tgg gag gaa gcg tca cag tcg cta ctg 162

Tyr Arg Cys Gly Glu Ser Pro Val Trp Glu Glu Ala Ser Gln Ser Leu Leu

15 20 25 30

ttt gta gat atc cct tca aag att att tgt cga tgg gat acg gtc agc aat 213

Asp Ile Pro Ser Lys Ile Ile Cys Arg Trp Asp Thr Val Ser Asn Gln Phe

35 40 45

caa gtg cag cga gtt gct gtg gat gcc cca gtc agt tca gtg gca ctt cga 264

Val Val Gln Arg Val Ala Val Asp Ala Pro Val Ser Ser Val Ala Leu Arg

50 55 60

cag ttg gga ggc tat gtt gcc acc att gga acc aag ttc tgt gct ttg aac 315

Gln Leu Gly Gly Tyr Val Ala Thr Ile Gly Thr Lys Phe Cys Ala Leu Asn

65 70 75 80

tgg gaa aat caa tca gta ttt gtc cta gcc atg gtg gat gaa gat aag aaa 366

Trp Glu Asn Gln Ser Val Phe Val Leu Ala Met Val Asp Glu Asp Lys Lys

85 90 95

aat aat cga ttc aat gat ggg aag gtg gat cct gct ggg aga tac ttt gct 417

Asn Asn Arg Phe Asn Asp Gly Lys Val Asp Pro Ala Gly Arg Tyr Phe Ala

100 105 110 115

ggg acc atg gct gag gaa acg gcc cca gct gtt ctt gag cgg cac caa ggg 468

Gly Thr Met Ala Glu Glu Thr Ala Pro Ala Val Leu Glu Arg His Gln Gly

120 125 130

tcc ttg tac tcc ctc ttt cct gat cac agt gtg aag aaa tac ttt gac caa 519

Ser Leu Tyr Ser Leu Phe Pro Asp His Ser Val Lys Lys Tyr Phe Asp Gln

135 140 145

gtg gat atc tcc aat ggt ttg gat tgg tcc ctg gac cat aaa atc ttc tac 570  
 Val Asp Ile Ser Asn Gly Leu Asp Trp Ser Leu Asp His Lys Ile Phe Tyr  
 150 155 160 165  
 tac att gac agc ctg tcc tac act gtg gat gcc ttt gac tat gac cta caa 621  
 Tyr Ile Asp Ser Leu Ser Tyr Thr Val Asp Ala Phe Asp Tyr Asp Leu Gln  
 170 175 180  
 aca gga cag att tcc aac cgc aga att gtt tac aag atg gaa aaa gat gaa 672  
 Thr Gly Gln Ile Ser Asn Arg Arg Ile Val Tyr Lys Met Glu Lys Asp Glu  
 185 190 195 200  
 Caa atc cca gat gga atg tgc att gat gct gag gga aag cta tgg gtg gcc 723  
 Gln Ile Pro Asp Gly Met Cys Ile Asp Ala Glu Gly Lys Leu Trp Val Ala  
 205 210 215  
 tgt tac aat gga gga aga gta att cgc ctg gat cct gag aca ggg aaa aga 774  
 Cys Tyr Asn Gly Gly Arg Val Ile Arg Leu Asp Pro Glu Thr Gly Lys Arg  
 220 225 230  
 ctg caa act gtg aag ttg cct gtt gat aaa aca act tca tgc tgc ttt gga 825  
 Leu Gln Thr Val Lys Leu Pro Val Asp Lys Thr Thr Ser Cys Cys Phe Gly  
 235 240 245 250  
 ggg aaa gat tac tct gaa atg tat gtg acc tgt gcc agg gat ggg ttg aat 876  
 Gly Lys Asp Tyr Ser Glu Met Tyr Val Thr Cys Ala Arg Asp Gly Leu Asn  
 255 260 265  
 gct gaa ggc ctt ttg agg cag cct gat gct ggt aac att ttc aag ata aca 927  
 Ala Glu Gly Leu Leu Arg Gln Pro Asp Ala Gly Asn Ile Phe Lys Ile Thr  
 270 275 280 285  
 ggt ctc gga gtc aaa gga att gcc cca tat tcc tat gca ggg t gaactgcagc 980  
 Gly Leu Gly Val Lys Gly Ile Ala Pro Tyr Ser Tyr Ala Gly  
 290 295 299  
 tcttccttgc tgtcagaaga aaaagctttg aagataactg aagaattaag ggactggaat 1040 caatgaactt  
 tcaatttagt tttttttaat gaggtggtga tattatagca tggttaagct 1100

ttaatttaca tctttgattg ggctctgggt gaataaacct agggcatagc atattaatga 1160  
agagtgtcat ccctggattc ctttatttac aattttttaa aggtcgaaga ttttccccag 1220  
agaatgacaa gtggttttga caacacactc taggccttct attaaaagca attctgtaga 1280  
aatgcaacag ggagttcaac tatcaatcag cctgatgatg gcaaattgct ctgggggttg 1340  
aaatgggact gtgaccattc ttttctgtg ttccatattt ctgcgcataa ggcttccaaa 1400  
acaaatcaat gcatagaaac ttaatgataa ttataatga ttatgtgact tttcatgtgt 1460  
gttattttac aaactaaaat actggcagaa gatgttattc aaaccctggg gcacaatctg 1520  
tggttctaat cgccacctag tggctataca aataaatgca tcacattgca aag 1573

<210> 3

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 3

gcgtcgaccg attcaatgat gggaaggtag a

<210> 4

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 4

gcgtcgacgg agaagcaaag ctgggtggca a

<210> 5



<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 5

ctagccatgg tggatgaaga t

<210> 6

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 6

caagtaactc taggtatgga c

<210> 7

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 7

tgggtgcttta cggatatgcc gctcccgatt

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/09243

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> A01K 67/027, C12N 15/12, C07K 14/47, C12P 21/08, C12N 15/06

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> A01K 67/027, C12N 15/12, C07K 14/47, C12P 21/08, C12N 15/06

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

BIOSIS, MEDLINE, WPIDS, EMBASE, BIOTECHABS

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX PY	Enomoto N. et al., Hepatology, vol.32, no.4. Pt.2, p.323A (2000)	1-8, 18, 19 9-17, 20-26
X Y	Enomoto N. et al., Hepatology, vol.30, no.4. Pt.2, p.510A (1999)	1-8, 18, 19 9-17, 20-26
Y	Delclerck P.J. et al., J.Biol.Chem., vol.270, pp.8397-8400 (1995)	1-26
Y	Castrop J. et al., Immunobiol., vol.193, pp.281-287 (1995)	1-26
Y	Fujita T. et al., Mechanisms of Ageing and Development, vol.107, pp.271-280 (1999)	1-26
Y	Fujita T. et al., Biochimica et Biophysica Acta, vol.1308, pp.49-57 (1996)	1-26

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:  
 "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance  
 "E" earlier document but published on or after the international filing date  
 "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)  
 "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means  
 "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"I" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention  
 "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone  
 "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art  
 "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
11 January, 2002 (11.01.02)Date of mailing of the international search report  
22 January, 2002 (22.01.02)Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl. A01K 67/027, C12N 15/12, C07K 14/47, C12P 21/08, C12N 15/06

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl. A01K 67/027, C12N 15/12, C07K 14/47, C12P 21/08, C12N 15/06

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

BIOSIS, MEDLINE, WPIDS, EMBASE, BIOTECHABS

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
PX PY	Enomoto N. et al., Hepatology, vol. 32, no. 4. Pt. 2, p. 323A (2000)	1-8, 18, 19 9-17, 20-26
X Y	Enomoto N. et al., Hepatology, vol. 30, no. 4. Pt. 2, p. 510A (1999)	1-8, 18, 19 9-17, 20-26
Y	Delclerck P. J. et al., J. Biol. Chem., vol. 270, pp. 8397-8400 (1995)	1-26

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

11. 01. 02

国際調査報告の発送日

22.01.02

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

長井 啓子



2B

9123

電話番号 03-3581-1101 内線 3236

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	Castrop J. et al., Immunobiol., vol.193, pp.281-287 (1995)	1-26
Y	Fujita T. et al., Mechanisms of Ageing and Development, vol.107, pp.271-280 (1999)	1-26
Y	Fujita T. et al., Biochimica et Biophysica Acta, vol.1308, pp.49-57 (1996)	1-26